





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

هوالشافی

جلسه دفاع از پایان نامه جهت اخذ دکترای حرفه ای پزشکی

بررسی فراوانی پلی مورفیسم های rs8069533 و rs222859 در ژن ybx2 مردان

از واسپر میا

دکتر سحر مقبلی نژاد

استاد راهنما

دکتر رضا نجفی پور

استاد مشاور

نگارش: محمد رضا حیدری خو

پاییز ۹۴

شماره پایان نامه

فهرست

- ۱- فصل اول مقدمه و اهمیت موضوع.....۲۴-۷
- ۲- فصل دوم مرور و بررسی متون.....۲۸-۲۵
- ۳- اهداف و فرضیات.....۳۰-۲۸
- ۴- فصل سوم مواد و روش کار.....۴۰-۳۰
- ۵- فصل چهارم نتایج و یافته ها.....۴۳-۴۱
- ۶- فصل پنجم بحث و نتیجه گیری پیشنهادها.....۴۶-۴۴
- ۷- فصل ششم فهرست منابع.....۵۶-۴۷

فهرست اشکال و جداول

۱- شکل ۱	۱۱
۲- شکل ۲	۱۲
۳- شکل ۳	۱۳
۴- شکل ۴	۱۴
۵- شکل ۵	۱۵
۶- شکل ۶	۳۷
۷- جدول ۱	۱۰
۸- جدول ۲	۳۷
۹- جدول ۳	۴۳
۱۰- جدول ۴	۴۳

چکیده:

مطالعات مدل حیوانی، نقش بالقوه ژن **MSY2** در روند اسپرماتوژنز نشان داده اند. برخی از جهش ها در این ژن که با ناباروری مردان انسان همراه است پیشنهاد شده اند. در این مطالعه، پلی مورفیسم ژن **exon1** **YBX2** بررسی شده است. در مجموع ۱۵۶ مرد مورد بررسی قرار گرفت. آنها شامل ۹۶ مرد با اسپرم زایی طبیعی، ۶۰ نفر با آزواسپرمی غیر انسدادی بودند. ما **DNA** را از خون و بافت بیضه نمونه ها استخراج کردیم، پلی مورفیسم **exon1** با استفاده از روش تعیین توالی آنالیز شد. نتایج توالی یابی نشان داد که در بین مطالعه پلی مورفیسم ها، فراوانی ژنوتیپ **TT** در پلی مورفیسم **rs222859** در بیماران آزواسپرمیای نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.001$). با توجه به نتایج بدست آمده، ژن **YBX2** ممکن است نقشی در تولید مثل مرد بازی کند. تغییرات این ژن ممکن است در آزواسپرمی در میان ایرانیان آزواسپرمی ایجاد شده باشد.

کلمات کلیدی: ژن **YBX2**، ناباروری، آزواسپرمی

فصل اول

مقدمه

و

اهمیت موضوع

ناباروری مردان :

ناباروری، ناتوانی جنسی فعال است، زن و شوهر که بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری در عرض یک سال قادر به رسیدن به حاملگی نیستند زوج نابارور خوانده می شوند(۱). حدود ۱۵ درصد از زوج ها ظرف مدت ۱ سال به بارداری دست نمی یابند، و در نهایت کمتر از ۵ درصد بچه دار نمی شوند. در ۱۰-۱۵٪ از زوج ها با استفاده از کار تشخیصی معمول هیچ علتی از ناباروری یافت نمی شود(۲). فاکتورهای مردانه مسئول ۵۰٪ از موارد ناباروری است (۳). ۳۰ تا ۴۰ درصد از موارد علت ناباروری مردان مشخص^۱ نیست (۳). لازم به ذکر است که باید بین ناباروری با علت غیر قابل توضیح^۲ و ناباروری مردان ایدیوپاتیک تفاوت قائل شد. خط تقسیم بین آنها تجزیه و تحلیل مایع منی است که در گروه های غیر قابل توضیح طبیعی بوده و در ناباروری ایدیوپاتیک غیر طبیعی است(۴). برای آنالیز سمن یک سری از پارامترها وجود دارد که توسط WHO ارائه شده (جدول ۲-۱)(۳).

در این افراد با ناباروری نامشخص حالت های مختلفی ممکن است مشاهده گردد که عبارتند از :

- (۱) کاهش تعداد اسپرم (اولیگو اسپرمیا)^۳
- (۲) کاهش حرکت اسپرم (آستنو اسپرمیا)^۴
- (۳) فرمهای بدشکل اسپرماتوزوآ از نظر ظاهری (تراتواسپرمیا)^۵
- (۴) گاهی ۳ مورد بالا با هم بوده و اولیگو استنو تراتو اسپرمیا نامیده می شود.^۶
- (۵) عدم مشاهده اسپرم (آزوسپرمیا)^۷(۳)

^۱ . Idiopathic Infertility
^۲ . Unexplained male infertility
^۳ . Oligozoospermia
^۴ . Asthenozoospermia
^۵ . Teratozoospermia
^۶ . Oligo-astheno-teratozoospermia
^۷ . Azoospermia

فاکتورهای پیش آگهی ناباروری مردان :

عوامل اصلی زیر پیش آگهی در ناباروری را تحت تاثیر قرار می دهد :

(۱) سن و وضعیت باروری شریک زن

(۲) مدت زمان ناباروری

(۳) ناباروری اولیه و ثانویه

(۴) نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مایع منی^(۲).

سن زن و کاهش ذخیره تخمدان مرتبط با آن مهم ترین متغیر مؤثر بر نتیجه ی تولید مثل هم بصورت خود به خودی و هم با کمک تکنیک های باروری است. بررسی شریک مرد شامل یک تاریخچه پزشکی کامل و معاینه فیزیکی با توجه به طرح استاندارد منتشر شده توسط WHO باید باشد، به طوری که هر عامل مرتبط با ناباروری مردان را می تواند تشخیص داده و در صورت امکان تحت درمان قرار داد. غربالگری هورمونی می تواند محدود به تعیین سطح هورمون های FSH^8 ، LH^9 و تستسترون باشد که در تمام مردان نابارور می بایست انجام گیرد. در آزواسپرما، تمایز بین علل انسدادی و غیر انسدادی بسیار مهم است. یک معیار بارزش برای پیش بینی منطقی آزواسپرما، انسدادی سطح نرمال هورمون FSH با حجم بیضه دوطرفی نرمال است. با این حال ۲۹ درصد از مردان با سطح نرمال FSH اسپرماتوژنز ناقص را نشان می دهند^(۲). اسپرماتوژنز ناقص معمولاً با افزایش در میزان سطح هورمون FSH نمونه خون همراه است^(۱). بیوپسی بیضه را می توان هم به دلایل تشخیصی و هم درمانی انجام داد^(۲). اسپرماتوزوای های بیضه می توانند با موفقیت برای تزریق داخل سیتوپلاسمی استفاده شوند. در ۶۰٪ موارد آزواسپرما، غیر انسدادی، اسپرماتوزوای توسط تکنیک های بازیابی اسپرم^{۱۰} از مردانی که کاندیدای انجام این روش هستند به دست می آیند و می بایست بدرستی مشاوره ژنتیک شوند، چراکه فاکتورهای ژنتیکی در به وجود آوردن آزواسپرما غیر انسدادی نقش اصلی را بازی می کنند. میزان حاملگی و تولد نوزاد زنده در آزواسپرما غیر انسدادی با استفاده از اسپرم های بدست آمده از بیضه و تکنیک های کمک باروری ۳۰ تا ۵۰ درصد است

⁸.Follicle-stimulating Hormone

⁹.Luteinising Hormone

¹⁰.Testicular Sperm Extraction

جدول ۱. پارامترهای صحیح آنالیز اسپرم بر اساس پارامترهای معرفی شده توسط WHO (۲).

پارامتر	مقدار
حجم سمن (میلی لیتر)	۱/۵ (۱/۴-۱/۷)
کل تعداد اسپرم ^{۱۱} (در هر بار مایع منی خارج شده)	۳۹ (۳۳-۴۶)
غلظت اسپرم ^{۱۲} (در هر میلی لیتر)	۱۵ (۱۲-۱۶)
حرکت کلی اسپرم (شدید+غیر شدید.٪)	۴۰ (۳۸-۴۲)
درصد زنده بودن اسپرم ها	۵۸ (۵۵-۶۳)
در صد اسپرم های نرمال از لحاظ ظاهری	۴ (۳-۴)
PH	> ۷/۲

درک روند اسپرماتوژنز یک پیش شرط لازم برای درمان است :

سلولهای جنسی مردان، از ذخیره سلول های بنیادی به وجود می آیند که در داخل لوله های سمنی فروس بیضه ها در تمام طول عمر از بلوغ تا دوران پیری تکامل می یابند. فرایند تکامل سلولهای جنسی اسپرماتوژنز نامیده می شود که شامل بخش های اسپرماتوگونیوز^{۱۱}، میوز، اسپرمیوژنز^{۱۲} و اسپرماسیون^{۱۳} می باشد (۵). کاهش در تعداد اسپرماتوزوا، غالب شدن اسپرماتوزوا ناقص و یا تحرک نامناسب اسپرماتوزوا ممکن است دلیل باروری به هم ریخته و یا ناباروری یک بیمار باشد. یک ارزیابی کامل از مایع انزالی ممکن است انواعی از به هم ریختگی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز را آشکار کند و یا عملکرد به هم ریخته بیضه ها و یا حتی سرطان بیضه اولیه را نشان دهد (۶).

این وضعیت پیچیده مرحله به مرحله توضیح داده می شود :

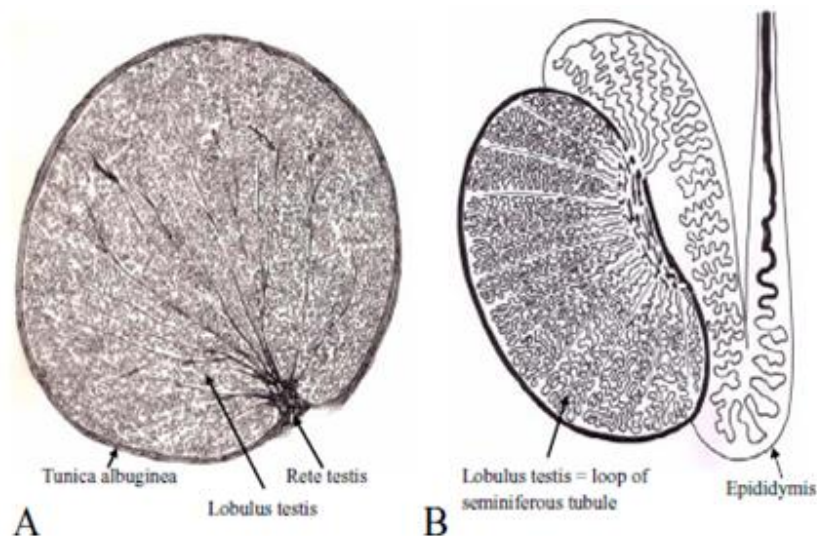
¹¹ . Spermatogoniogenesis

¹² . Spermiogenesis

¹³ . Spermiation

سازمان بندی بیضه :

بیضه های انسان دو عضو تخم مرغی شکل با قطرهای 2.5 در 4 سانتی متر هستند که در یک کپسولی از جنس بافت همبند قوی تونیکا آلبوژینا^{۱۴} غوطه ور شده است (شکل ۲-۱ A). لوبول ها شامل لوله های سمی فروس و بافت بینابینی لوله ها که خود حاوی سلول های اندوکرینی لیدیگ هستند. لوله های سمی فروس لوب های پیچ خورده هستند (شکل ۲-۱ B). مایعات از طریق لوله های سمی فروس ترشح شده در rete جمع آوری می شوند و از طریق سیستم مجاری بیرون دهنده اپی دیدیم منتقل می شوند (۶).



شکل (۱). (A) مقطع عرضی از بیضه انسان. (B) آرایش لوله های سمی فروس در بیضه انسان و از سیستم بیرون ریزنده (ductular) از اپی دیدیم. نقاشی نیمه شماتیک (۱۰).

ساختار لوله سمی فروس :

لوله سمی فروس شامل اپی تلیوم ژرمینال و بافت اطراف لوله لامینا پروپریا^{۱۵} (شکل ۲-۱ C) است (۷). میانگین قطر لوله های سمی فروس 180μm، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال 80μm، وضخامت بافت اطراف لوله 8μm است. اپی تلیوم ژرمینال شامل مراحل تکاملی مختلفی از ژرم سل ها است که اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه واسپرماتید خوانده می شوند. این سلول ها در لابه لا وپیچ خوردگی سلول های سرتولی قرار می گیرند (۶). سلول های سرتولی منشوری توسط نواحیه ی ویژه ی اتصالات محکم^{۱۶} از غشاء سلولی به هم متصل هستند که اپی تلیوم ژرمینال را به قسمت های پایه و adluminal جدا کرده اند. در طول بلوغ سلولهای جنسی از این مرز عبور کرده وارد قسمت adluminal می شوند. در سلول های

¹⁴. Tunica albuginea

¹⁵. lamina propria

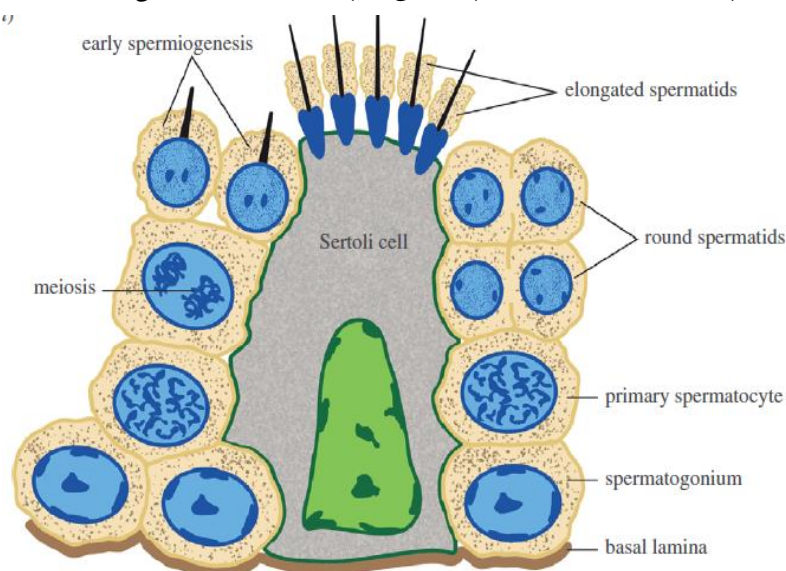
¹⁶. Tight Junction

سرتولی، افزایش مقدار قطرات لیپیدی در ارتباط با شروع افزایش سن یک شاخصی از "ساعت بیولوژیکی" در بیضه ها است (۵). عملکردهای دیگری نیز به سلول های سرتولی نسبت داده شده (۶):

۱. عملکردهای حمایتی و تغذیه ای برای سلولهای جنسی
۲. سازماندهی در انتقال اسپرماتیدهای بالغ به لومن لوله ها^{۱۷}
۳. تولید مواد اندوکرینی و پاراکرینی برای تنظیم اسپرماتوژنز
۴. ترشح پروتئین متصل شونده آندروژن (ABP)^{۱۸} برای نگهداری از اپیتلیال سیستم مجرای بیرون دهنده
۵. برهم کنش با سلول های لیدیک اندوکرینی ما بین لوله ای.

اسپرماتوژنز^{۱۹}:

اسپرماتوژنز فرایندی پیچیده است، وابسته به جمعیت سلولهای جنسی که اسپرماتوزو را تولید می کنند. اسپرماتوژنز پس از یک دوره طولانی مقدماتی "prespermatogenesis" در دوران جنینی و نوزادی، در هنگام بلوغ آغاز می شود. سه مرحله عمده را می توان تشخیص داد: اسپرماتوگونیوژنز، بلوغ اسپرماتوسیت و اسپرمیوژنز که تمایز سیتوپلاسمی اسپرماتیدهاست شکل (۲-۲) (۶).



شکل (۲). لوله سمی فروس که نشان دهنده ژرم سل های در حال تکامل در داخل سلول سرتولی اسپرماتوگونی تحت تقسیم میتوز قرار می گیرند، و در نهایت تبدیل به اسپرماتوسیت میوزی می شود (۱۲۱).

¹⁷ . Spermiation

¹⁸ . Androgen Binding Protein

¹⁹ .Spermatogenesis

اسپر ماتوگونیوژنز^{۲۰} :

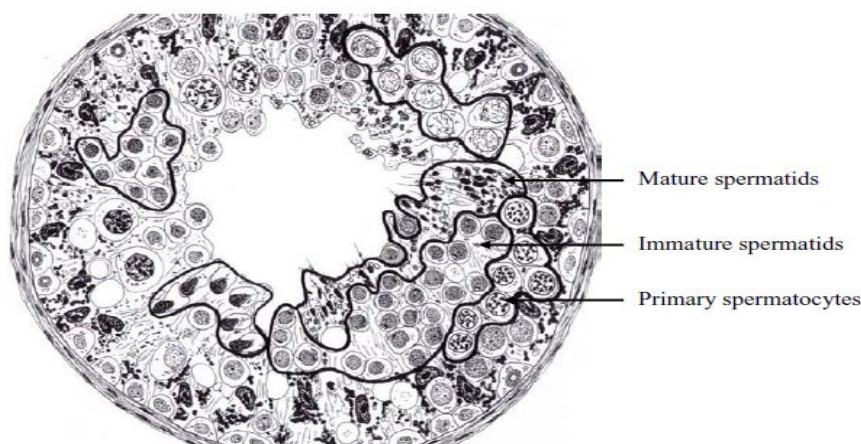
انواع مختلفی از اسپر ماتوگونی توسط موقعیت خود در بخش پایه ای از اپیتلیوم ژرمینال، با توانایی رنگ پذیری هسته قابل تشخیص هستند :

(۱) نوع A کم رنگ اسپر ماتوگونی^{۲۱}

(۲) نوع A تیره اسپر ماتوگونی^{۲۲}

(۳) نوع B اسپر ماتوگونی^{۲۳}

نوع A اسپر ماتوگونی متعلق به ذخیره سلول های بنیادی است. نوع B- اسپر ماتوگونی نشان دهنده شروع تکامل سلول های جنسی به سمت اسپر ماتیدها است (۶). اسپر ماتوگونی ها چندین نسخه متوالی از تقسیمات پی در پی میتوز دارند. تقسیمات سلول های اسپر ماتوگونی معمولاً ناقص هستند. سلول های دختری از طریق پل های سیتوپلاسمیک به هم متصل باقی مانده، بنابراین یک کلون مشتق از یک سلول بنیادی شکل می گیرد که چندین هسته دارد. گمان بر این است که تشکیل این کلون ها اساس تکامل هماهنگ سلول های جنسی است (شکل ۲-۳) (۶).



شکل (۳) لوله های سمنی فروس با کلون مشخص از سلول های زایا. $\times 300$ (۶).

هر دو نوع اسپر ماتوگونی A برای اسپر ماتوژنز صحیح ضروری هستند. در زمان کاهش اسپر ماتوژنز نوع A تیره اسپر ماتوگونی اغلب وجود ندارند. البته، در صورت عدم وجود هر دو نوع سلول های اسپر ماتوگونی، هیچ

²⁰ . Spermatogoniogenesis

²¹ . A pale type- spermatogonia

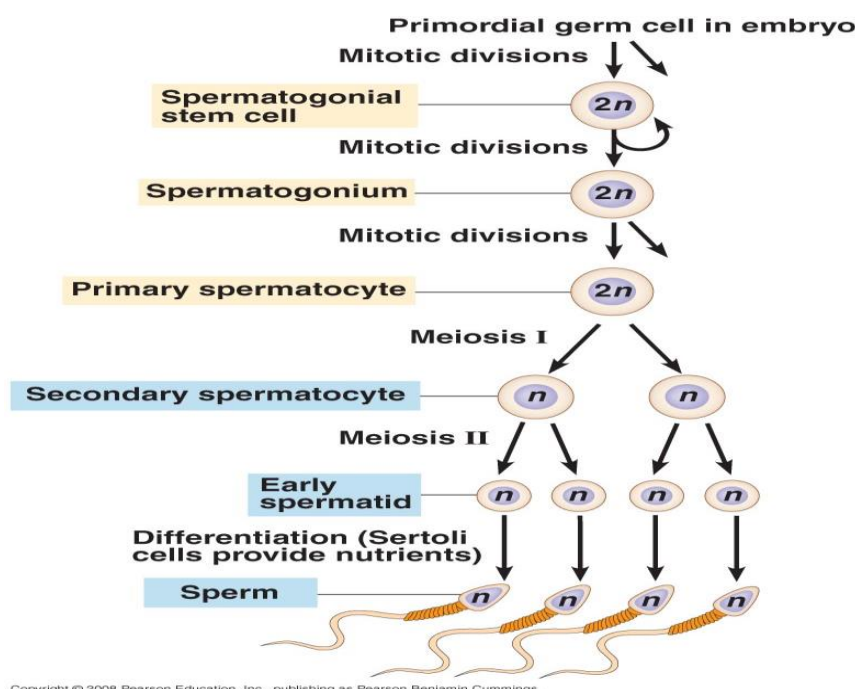
²² .A pale type- spermatogonia

²³ .B type-spermatogonia

اسپرماتوژنزی انجام نمی شود و اپی تلوم ژرمینال فقط حاوی سلول های سرتولی خواهد بود. اسپرماتوگونی ها ممکن است از زمان تولد غایب باشند^{۲۴} و یا ممکن است به وسیله توکسیک های مختلف تخریب شده باشند، مانند پرتو-X (سندرم SCO مادرزادی)^{۲۵}.

تقسیم میوز اسپرماتوسیت^{۲۶}:

مرحله تقسیم میوز بواسطه تغییر در شکل کروماتین هسته بعد از آخرین تقسیم در اسپرماتوگونی مشخص می گردد. سلول ها در تقسیم میوز اسپرماتوسیت نامیده می شوند. فرایند تقسیم میوز شامل دو تقسیم است سلول های قبل از تقسیم اول میوز اسپرماتوسیت اولیه و سلولهای ها قبل از تقسیم دوم میوز اسپرماتوسیت ثانویه نامیده می شوند (شکل ۲-۴). اسپرماتوسیت های اولیه بزرگترین ژرم سل های اپی تلوم ژرمینال هستند. تقسیم میوز اسپرماتوسیت ها با مرحله لپتوتن از پروفاز آغاز می شود. بعد از عبور از سد سلول های سرتولی، مرحله اولیه تقسیم سلولی ادامه یافته و با نام های زیگوتن، پاکیتن، دیپلوتن شناخته می شوند. در طی مرحله اولیه تقسیم سلولی همانندسازی DNA، متراکم شدن کروموزوم، جفت شدن کروموزوم های همولوگ و کراسینگ اور اتفاق می افتد. بعد از تقسم سلولهای جنسی، اسپرماتوسیت های ثانویه ایجاد می شوند و به سرعت به اسپرماتیدها تقسیم می شوند. اینها به اسپرماتیدها بالغ تمایز می یابند (۶).



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

²⁴ . Congenital Sertoli cell-only Syndrome

²⁵ . Syndrom acquired Sertoli cell-only

²⁶ . Meiosis of spermatocytes

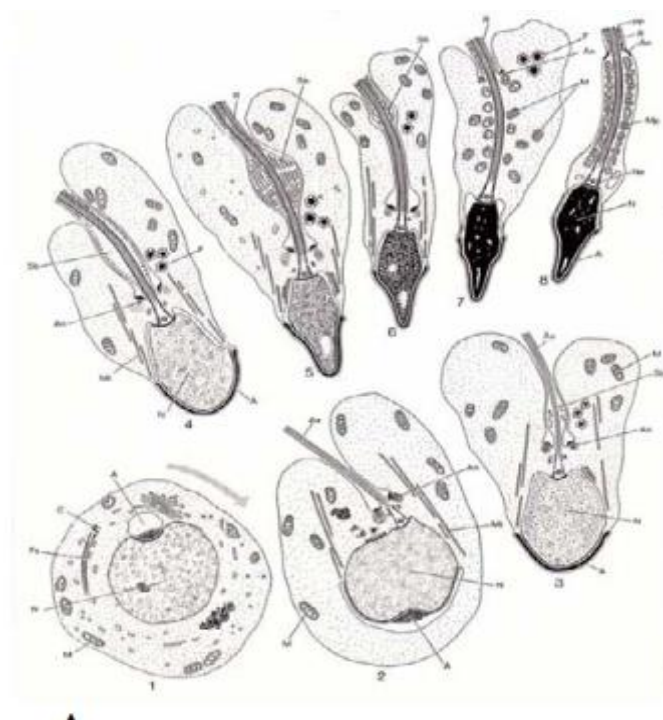
شکل (۴). "ازهر اسپرماتوسیت اولیه ۴۶ کروموزومی حاصل از تقسیم میتوز، در اثر تقسیم میوز I دو سلول اسپرماتوسیت ثانویه ۲۳ کروموزومی و بعد از تقسیم میوز II، چهار سلول هاپلوئید اسپرماتید بوجود می آید" (۸).

اسپرمیوژنز :

در طول تمایز سیتوپلاسم اسپرماتید ها سه فرایند اتفاق می افتد (شکل ۲-۵).

- تراکم کروماتین هسته در حدود یک دهم حجم اسپرماتید نابالغ
- تشکیل cap آکروزوم پر شده از آنزیم توسط دستگاه گلژی و اتصال آن به هسته
- تکامل ساختار فلاژل و جاگیری آن در هسته

در اسپرماتید های تکامل یافته وضعیتی که آنها را قادر می سازد تا در طی یک فرایند پیچیده اپیتلیوم ژرمینال را ترک کنند، اسپرمیشن نامیده می شود (۶). به طور خلاصه، تمایز اسپرماتیدها به هشت مرحله تقسیم می شود که در شکل نمایش داده شده (شکل ۲-۵) (۱۰).



شکل (۵). مراحل تمایز اسپرماتید: (مرحله ۱) اسپرماتید نابالغ با هسته گرد. وزیکول آکروزوم به هسته متصل می شود، زائده دم در تماس با هسته موفق نیست. (مرحله ۲) کیسه آکروزوم بر روی هسته افزایش یافته و مسطح می شود. دم به هسته متصل می شود. (مرحله ۳-۸) آکروزوم شکل گرفته، هسته متراکم شده و تکامل ساختار دم اتفاق می افتد. (مرحله ۸) اسپرماتید بالغ از اپیتلیوم ژرمینال آزاد می شود. طراحی بر اساس میکروگراف الکترونی (۹).

اسپرمیشن^{۲۷}:

انتقال اسپرماتیدهای بالغ از اپی تلیوم ژرمینال توسط سلول های سرتولی مدیریت می شود. در نتیجه ی یک مشارکت پیچیده از میانجی گری فیلامنت ها و لوله های سیتوپلاسمیک سلولهای سرتولی، اسپرماتیدها به مرز لومن لوله های سمنی فروس پیشرفت می کنند(۶). اسپرماتیدهای بالغ نزدیک پل های مابین سلولی قرار دارند ، تماس آنها با اپی تلیوم ژرمینال قطع شده و سلول ها آزاد می شوند، اکنون آنها اسپرماتوزوا نامیده می شوند (۱۱).

مشخصات اسپرماتوزنز طبیعی بر اساس برش های هیستولوژیکی(۶):

- حداقل قطر لوله های سمنی فروس $180\mu\text{m}$
 - حضور انواع A dark, A pale, B اسپرماتوگونی
 - حضور اسپرماتوسیت های اولیه و ثانویه
 - تمایز اسپرماتیدها
 - منطقه اسپرمیشن
 - حداقل امتیاز ۸ در ارزیابی اسپرماتوزنز
 - لومن لوله های سمنی فروس
 - توزیع نرمال لیپید در سیتوپلاسم سلول های سرتولی
 - حضور مراحل مختلف اسپرماتوگونی
 - تشکیل کلونی هایی از ژرم سل ها
 - حداکثر ضخامت $8\mu\text{m}$ برای lamina propria در لوله های سمنی فروس
- ساختار طبیعی و توزیع سلول های لیدینگ

سینتیک اسپرماتوزنز^{۲۸}:

اسپرماتوزنز در طی دوران بلوغ آغاز می شود و در سراسر طول زندگی و تا سن پیری ، به علت ذخیره سلول های بنیادی پایدار ادامه دار است. سلول های جنسی بیشماری تکامل یافته و از طریق لوله های سمنی فروس منتقل می شوند. روند اسپرماتوزنز بشدت سازمان یافته است : اسپرماتوگونی ها دائماً تقسیم می شوند، قسمتی به صورت اسپرماتوگونی باقی می ماند و قسمتی وارد اسپرماتوزنز می شوند. گروه های سلولی منشاء گرفته از تقسیم اسپرماتوگونی، از قسمت پایه ای به قسمت adluminal اپی تلیوم ژرمینال مهاجرت

²⁷ . Spermiation

²⁸ . Kinetics of spermatogenesis

می کنند. گروه های سلولی با تکامل متفاوت در برش های سمنی فروس در برش هایی از لوله های سمنی فروس دیده می شوند و در مشارکت با ویژگی عمومی اپی تلیوم ژرمینال هستند. در هر منطقه باتوجه به اپی تلیوم ژرمینال هر ۱۶ روز ویژگی عمومی همان گروه ژرم سل ظاهر می شود. این دوره زمانی " چرخه اپی تلیوم سمنی فروس"^{۲۹} نامیده می شود (۱۲). تکامل نوع A- اسپرماتوگونی به اسپرماتید بالغ چهار تا شش چرخه ، ۷۴ روز نیاز دارد. انتقال اسپرماتید بالغ از اپی تلیوم ژرمینال به عنوان اسپرماتوزوا از طریق سیستم مجرای اپیدیدیم در طی ۱۲ روز اضافی دیگر انجام می شود. بنابراین، ۸۶ روز حداقل زمان محاسبه شده برای یک چرخه کامل اسپرماتوژنز از اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزوا بالغ است (۶).

محصولات اسپرماتوژنز: اسپرماتوزوا

اسپرماتوزوا ها با شکل منحصر به فرد برای انتقال به گامت مونث مناسب هستند. برای این منظور، هسته اسپرماتوزوا متراکم می شود ، برای برقراری تماس با گامت زن با یک آکروزوم پوشش داده می شود و برای حرکت پیش رونده به یک فلاژل متصل می شود. قطر سر اسپرماتوزوا ۴-۵μm است ، قطر فلاژل ۱-۲μm و طول اسپرماتوزوا ۶۰μm است (۱۰).

کارایی در روند اسپرماتوژنز^{۳۰}:

سلولهای جنسی در طول اسپرماتوژنز از دست می روند و تعداد اسپرماتوزوا های بدشکل در مایع انزالی بشدت افزایش می یابند . ظرفیت بالقوه اسپرماتوژنز ۱۰۰٪ محاسبه شده ، که ۷۵٪ از سلولهای جنسی تکامل یافته توسط آپوپتوز و یا تخریب از دست می روند. فقط ۲۵٪ از سلولهای جنسی به مایع انزالی می رسند که بیش از نیمی از آنها بدشکل هستند. بنابراین، فقط ۱۲٪ از پتانسیل اسپرماتوژنز برای تولید مثل در دسترس است (۶). در مقایسه با حیوانات آزمایشگاهی بازده اسپرماتوژنز در انسان به نظر ناچیز است. در این رابطه یکی از معیارهای مورد توجه میانگین نسبت اسپرماتید های کشیده به سلول های سرتولی ۳ تا ۴ در اپی تلیوم ژرمینال انسان در مقابل ۱۲ در رت ها است (۱۳). براساس این محاسبات تعداد زیادی از اسپرماتوزواها را باید در مایع انزالی نسبت به مقدار کمتر از ۲۰ میلیون اسپرماتوزوایی در هر میلی لیتر از مایع انزالی انتظار داشت ، همانگونه که در کتابچه WHO به عنوان مقدار نرمال پیشنهاد شده است (۱۴).

اختلال اسپرماتوژنز^{۳۱}:

²⁹ . cycle of the seminiferous epithelium

³⁰ . Efficiency of spermatogenesis

³¹ . Disturbances of spermatogenesis

تکثیر و تمایز سلولهای جنسی و مکانیسم های تنظیمی داخل وخارج بیضه ای در هر مرحله می تواند مختل شود (۹). این ممکن است در نتیجه تاثیرات محیطی ویا به سبب بیماری های که به طور مستقیم ویا غیر مستقیم بر اسپرماتوژنز تاثیر بگذارد. علاوه بر این، مواد مغذی مختلف ، داروها ، هورمون ها و متابولیت های شان ، مواد مختلف سمی یا تابش پرتوX سبب کاهش ویا تخریب اسپرماتوژنز شوند. سرانجام یک ماده سمی نسبتا ساده منجر به افزایش درجه حرارت می شود که فعالیت اسپرماتوژنز را در بیضه ها کاهش می دهد (۶).

محاسبه امتیازات برای ارزیابی اسپرماتوژنز (۱۵) :

- ۱۰- اسپرماتوژنز سالم و دست نخورده: بسیاری از اسپرماتید های بالغ و مناطق spermiation
- ۹ - اسپرماتوژنز نسبتاً کم: کاهش تعداد اسپرم بالغ، تعداد کمی مناطق spermiation
- ۸ - کاهش متمایز اسپرماتوژنز: تعداد کمی اسپرماتید های بالغ، بدون spermiation
- ۷ - اسپرماتوژنز، بطور قابل توجهی کاهش می یابد: بدون اسپرماتید بالغ، فقط اسپرماتید نابالغ، بدون spermiation
- ۶ - اسپرماتوژنز به شدت کاهش می یابد: فقط تعداد کمی اسپرماتید نابالغ، کاهش ارتفاع اپی تلیوم ژرمینال
- ۵ - توقف روند اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه: بسیاری از اسپرماتوسیتها در مرز لومن لوله های سمی فروس
- ۴ - توقف روند اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه: تعداد کمی اسپرماتوسیت اولیه حضور دارند
- ۳ - توقف در مرحله اسپرماتوگونی: نوع A اسپرماتوگونی چندین نسخه دارند اما به سمت سلولهای بالغ اسپرماتوژنز تکامل نمی یابند.
- ۲ - بدون سلولهای زایای، فقط سلول های رده سرتولی حضور دارند
- ۱- بدون سلولهای ژرمینال، بدون سلول های رده سرتولی. لوله های سمی فروس توسط بافت همبند ماده زمینه ای جایگزین می شوند.

درک روند اسپرماتوژنز از جنبه های کمک تولید مثلی :

امروزه روش های موجود کمک تولید مثلی در دانش پایه اسپرماتوژنز بنیان نهاده شده اند. با استفاده از تکنیک های تخصصی از استخراج اسپرم از بافت بیضه (TESE)^{۳۲} در ترکیب با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)^{۳۳} حاملگی را می تواند القاء کند. حتی در موارد نامطلوب ناباروری مردان (آزواسپرمی در انزال، سطوح بالای FSH^{۳۴}) در بیش از ۵۰٪ ICSI گامت نر سازگار را می توان شناسایی و برای لقاح مورد استفاده قرار داد (۱۶).

عوامل دخیل در اسپرماتوژنز ناقص :

ناباروری با علل مردانه یک اختلال پیچیده ای است که بخش بزرگی از جمعیت را تحت تاثیر قرار داده است، با این حال، بسیاری از علل آن ناشناخته است. روشن کردن اساس ژنتیکی زمینه ای فنوتیپ نابارور، ممکن است به کشف علل ناباروری و کمک به درمان موثر برای بیماران منجر شود (۱۷). اما در یک دسته بندی کلی می توان دلایل نقص در اسپرماتوژنز را در سه گروه تقسیم کرد :

(۱) عوامل اکتسابی^{۳۵} (۲) عوامل مادرزادی^{۳۶} (۳) عوامل ناشناخته^{۳۷}

عوامل اکتسابی :

از جمله عوامل مهمی که در این دسته قرار می گیرند شامل : عفونت و التهاب، فاکتورهای ایمنولوژیک ، جراحی و آسیب های ناشی از جراحی اندام های تولید مثل، مواد شیمیایی و قرار گرفتن در معرض تشعشع (۱۸).

عفونت و التهاب :

فرآیندهای عفونی ممکن است منجر به بدتر شدن اسپرماتوژنز، اختلال عملکرد اسپرم و یا انسداد مجاری منی شوند (۱۹). گاهی اوقات ابتلا به برخی از عفونت ها می تواند سبب تشکیل آنتی بادی های خودی بر علیه اسپرم شود (۲۰).

³² . Testicular Sperm Extraction

³³ . Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

³⁴ . Follicle-stimulating Hormone

³⁵ . Acquired Infertility

³⁶ . Congenital Infertility

³⁷ . Idiopathic

فاکتور های ایمنولوژیک :

آنتی اسپرم آنتی بادی^{۳۸} به عنوان یک ایمنوگلوبولین با فعالیت آنتی بادی علیه آنتی ژن اسپرم است که در ناباروری نقش ایفاء می کند. ASA ممکن است جزء اتو آنتی بادی های طبیعی باشد (۲۱).

جراحی و آسیب های ناشی از جراحی دستگاه تناسلی :

مداخلات هرینوپلاستی^{۳۹} کشاله ران که اغلب در شیرخوارگی انجام می شود ممکن است موجب آسیب دیدن لوله ها شده و سپس شرایط انسداد مجاری منی را ایجاد کند (۲۲).

مواد سمی :

درمان دارویی و پرتودرمانی برای تومورها معمولا باعث آسیب غیر قابل برگشت به اسپرماتوژنزمی شوند. حتی هورمون درمانی با دوز بالا، درمان آنتی بیوتیکی با : تتراسایکلین، سولفاسالازین؛ اغلب به طور موقت روند اسپرماتوژن را تغییر می دهند (۲۲).

علل مادرزادی :

واریکوسل :

یکی دیگر از علل شایع ناباروری مردان واریکوسل است. علت واریکوسل به طور کامل روشن نیست. اثر نامطلوب واریکوسل بر روی اسپرماتوژن را می توان به عوامل بسیاری از جمله افزایش دمای بیضه افزایش فشار داخل بیضه ، هیپوکسی به علت تضعیف جریان خون، ریفلاکس معده و متابولیت های سمی از غدد آدرنال و اختلالات هورمونی نسبت داد (۲۳).

ناهنجاری های اندو کرین :

تمام مردان مبتلا به هیپوگنادیسم هایپوگنادوتروپیک باید برای مشاوره ژنتیک مراجعه کنند، تقریبا تمام ناهنجاری های مادرزادی هیپوتالاموس به علت یک تغییر ژنتیکی می باشد (۲۲). یکی دیگر از نتایج احتمالی جهش در ژن گیرنده آندروژن سندرم Kennedy است. یک اختلال عصبی است که اختلال در اسپرماتوژن مشخصه آن است. سندروم Kallmann در نتیجه جهش در ژن KAL1 است، و با نقص در ترشح هورمون GnRH از هیپوتالاموس شناسایی می شود (۱۷).

³⁸.Antisperm antibody

³⁹.Herinoplasty

عوامل ژنتیکی :

ناهنجاری های ژنتیکی ۱۵٪ تا ۳۰٪ از فاکتورهای مردانه ناباروری را شامل می شوند (۲۴). فاکتورهای ژنتیکی با تاثیر بر روند های گوناگون فیزیولوژیکی نظیر هموستاز هورمون، اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرم ها در ناباروری مداخله می کنند (۱۷). ناهنجاری های کروموزومی تقریباً ۶ درصد از تمام مردان نابارور را شامل می شود. فاکتور های ژنتیکی نقش مهمی را در آواسپرمی غیر انسدادی بازی می کنند. دو طبقه بندی عمومی از فاکتور های ژنتیکی مرتبط با آواسپرمی غیر انسدادی وجود دارد (۲۲) :

(۱) ناهنجاری کروموزومی که منجر به عملکرد ناقص بیضه ها می شود.

(۲) Microdeletion های کروموزوم Y که منجر به اسپرماتوژنز ناقص می شود.

ناهنجارهای کروموزومی :

آنیوپلویدی^{۴۰}، رایج ترین خطا ناشی از ناهنجاری های کروموزومی در مردان نابارور است. مردان با مشکل آواسپرمی غیر انسدادی شیوع بالای آنیوپلویدی، به خصوص در کروموزوم های جنسی خود را دارند. نشانگان کلاین فیلتر، شایع ترین ناهنجاری کروموزومی ناشی از آنیوپلویدی، با شیوع ۵٪ در مردان با اولیگواسپرمی شدید و ۱۰٪ در مردان آواسپرم است. سندرم معمولاً باعث توقف اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه^{۴۱} می شود، اما گاهی اوقات مراحل بعدی از تکامل اسپرم مشاهده می شوند. بیماران مبتلا به سندرم کلاین فیلتر ممکن است برای بچه دار شدن از روش ISCI استفاده کنند، اما آنها در معرض خطر تولید فرزندان با ناهنجاری های کروموزومی اند. توصیه می شود که تشخیص ژنتیکی پیش از لانه گزینی (PGD) قبل از ART^{۴۲} انجام شود تا از این که فرزندان آنیوپلویدی نباشند، اطمینان حاصل شود (۱۷). جابجایی کروموزومی^{۴۳} یک منشاء دیگری برای آنیوپلویدی است. جابجایی های اتوزومی ۴ تا ۱۰ برابر بیشتر احتمال دارد در مردان نابارور در مقایسه با مردان سالم پیدا شود. جابجایی رابرتسونین^{۴۴}، شایع ترین ناهنجاری ساختاری کروموزومی در بدن انسان است که باروری در یکی از ۱۰۰۰ مرد را تحت تاثیر قرار می دهد. جابجایی رابرتسونین در مردان آواسپرم و اولیگواسپرمی، با نرخ ۱،۶٪ و ۰،۹٪ شایع تر هستند (۱۷). جهش ژن های اتوزومی :

⁴⁰ . Aneuploidy

⁴¹ . Primary spermatocyte

⁴² . Assisted Reproductive Technology

⁴³ . Translocation

⁴⁴ . Robertsonian Translocation

بسیاری از ژن های اتوزومی مانند FSH2, LH, YBX2, AR, CFTR,... نیز برای نقش احتمالی در ناباروری با علل مردانه بررسی شده است. ژن ^{۴۵}CFTR، بر روی کروموزوم ۷ قرار دارد، در ۶۰٪ - ۹۰٪ از بیماران مبتلا به فقدان مادرزادی دو طرفه مجرای دفران جهش یافته است. تکنیک ICSI روش مفیدی برای درمان مردانی با جهش CFTR است به شرطی که زن جهش CFTR را حمل نکن. در این تحقیق ما بر روی پلی مورفیسم های ژن YBX2 تمرکز نمودیم (۱۷).

کروموزوم Y و ژن های دخیل در ناباروری :

کروموزوم Y یک منطقه دارای پتانسیل زیاد به منظور مطالعه ناباروری با علل مردانه است، زیرا حاوی بسیاری از ژن هایی است که برای روند اسپرماتوژنز و تکامل غدد جنسی مردانه هم بسیار مهم هستند (۲۵) یک منطقه خاص مورد علاقه در Yq منطقه فاکتور آزو اسپرمی^{۴۶} است، که حاوی ژن های دخیل در رشد و تکامل اسپرم است. منطقه AZF شامل سه ناحیه : AZFa، AZFb و AZFc است. حذف های ژن های متعدد از مناطق AZFb و AZFc می تواند طیف گسترده ای از فنوتیپ نابارور را ایجاد کنند (۲۵).

پروتئین Y-box2 موشی :

پروتئینهای Y-box در اصل به عنوان پروتئینهای متصل شونده به DNA هستند که با استفاده از دامین حفظ شده cold shock در ارتباط با توالی مورد توافق Y-box در DNA می باشند (۲۶). بعداً مشخص شد که این پروتئین پروتئین متصل شونده به RNA نیز می باشد که برای اولین بار در تعامل با mRNA هایی که در هسته رونویسی می شوند شناسائی شد. بسیاری از پروتئین های Y-box با mRNA به سیتوپلاسم حرکت می کنند، جاییکه آنها سرنوشت خود را تنظیم می کنند (۲۷). یکی از بهترین موارد مورد مطالعه قرار گرفته پروتئین های Y-box، FRGY2 ها می باشند که دارای سطح زیادی در سیتوپلاسم اووسیت، *Xenopus laevis* هستند، جاییکه در آن با عملکرد خود mRNA های مادری رامسدود می کنند (۲۸). MSY2 موش، که در اصل به موجب توالی یکسان آن با FRGY2 مشخص شد (۲۹)، و به طور اختصاصی در سلولهای جنسی موش های مذکر و مونث بیان می شود (۳۰). برای روشن کردن نقش عملکردی MSY2 در سلول های زایا، Yang و همکاران (۲۰۰۵) موش های نول MSY2 را ایجاد کردند (۳۱). آنها دریافتند که موش های نر جهش یافته تعداد غیر طبیعی بالایی از آپوپتوز اسپرماتوسیت میوزدارند، که منجر به از دست رفتن زیادی از مرحله 8/9 اسپرماتیدها، و همچنین باعث ایجاد اسپرماتید چند-هسته ای، بدشکل، فقدان اسپرماتوزو در اپی دیدیمیس و در نهایت ناباروری می گردد (۳۲). به طور مشابه، موش های ماده جهش

⁴⁵. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

⁴⁶. Azospermia Factor

یافته نقص در تخمک گذاری، از دست دادن زودرس تخمک و ناباروری را نشان دادند (۳۱). برای درک نقش مولکولی MSY2 در اسپرماتوژنز، Yang و همکاران (۲۰۰۵)، mRNAs هایی که به طور ویژه به وسیله MSY2 در ژرم سل های مذکر پوشانده می شوند را شناسایی کردند (۳۳). آنها دریافتند که اکثریت MSY2 ها یک توالی موتیف Y-box در ناحیه پروموتور ژن های مربوطه شان را دارند. این نشان می دهد که MSY2 ابتدا این پروموتورهای ویژه را شناسائی می کند، سپس به mRNA های رونویسی شده از این پروموتورها متصل می شود. این کار یک ابزار کار آمد با قدرت انتخاب بالا ایجاد می کند تا بیان ژن را کنترل کنند، و توسط این واقعیت پشتیبانی می شود که MSY2، مانند FRGY2، می تواند به RNA و DNA متصل شود (۲۶) در میان ژن ها، به احتمال زیاد این مکانیسم، بیان ژن های Pmr1 و Tnp2 را کنترل می کند، که هر دو دارای Y-box در پروموتور خود هستند و کاهش بیان شدیدی در بیضه های MSY2-نول نشان می دهند. به دلیل آنکه ژن های Pmr1 و Tnp2 برای سازمان دهی ساختار کروماتین اسپرماتید در طی آخرین مراحل اسپرماتوژنزیاتی هستند، فقدان بیان آنها در مرحله آخر اسپرماتیدهای Msy2-null احتمالاً باعث نقص در تراکم هسته می گردد (۳۴). به دلیل آنکه MSY2 با هر دوی DNA و RNA در اندرکنش است و می تواند بطور بالقوه در بسیاری از سطوح مختلف فعالیت کنند. Yang و همکاران (۲۰۰۷). نشان دادند که از دست دادن Msy2 تاثیری بر روی رونویسی، اسپلایسینگ mRNA و یا نقل و انتقال داخل سلولی mRNA ندارد ولی در عوض اثر انتخابی بر روی میزان ترجمه دارد (۳۲). به طور ویژه، فقدان ژن Msy2 منجر به انتقال mRNAs های محدود به ریبونکلئوپروتئین (RNPs) به روی پلی زوم ها می شود. این نشان می دهد که MSY2 بطور نرمال ترجمه زیر مجموعه هایی از mRNA های ژرم سل ها را سرکوب می کند. شناسایی سیگنالی که سرکوب ترجمه را آزاد می کند جالب توجه است، که موجب القاء ترجمه ی mRNA های محدود به MSY2 در زمان مناسب در حین تکامل ژرم سل ها می شود. اخیراً، Medvedev و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فسفوریلاسیون MSY2 توسط cyclin وابسته کیناز-۱ باعث تخریب چند mRNA های ذخیره شده در تخمک شده است. این نکته برای تعیین اینکه آیا ژرم سل های مردانه مکانیسمی مشابه برای تنظیم ترجمه mRNA های پدیری محدود به MSY2 بکار می گیرند، مهم خواهد بود (۳۵).

ژن Contrin :

ژن Contrin بروی کروموزوم 17p11.2-13.1 واقع شده است، که با نام رسمی Y box binding protein 2 شناخته می شود و ممکن است با نام های DBPC; MSY2; CSDA3; CONTRIN نیز شناخته شود.

آنالیز سکانس cDNA، پروتئین Contrin نشان داد که این یک پروتئین بسیار مشابه همولوگ با پروتئین Y-box ژرم سل موش وزنوپوس با دامین "cold shock" و چهار جزیره آروماتیک بازی می باشد. Contrin به شدت بازی و مملو از آمینواسیدهای آرژنین و پرولین بوده و همچنین حاوی هفت جایگاه فسفوریلاسیون کازئین کیناز ۲ و سه جایگاه فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C است و این نشان می دهد که Contrin در vivo بشدت فسفریله می باشد. این پروتئین همچنین حاوی دو سیگنال مستقر شونده در هسته (NLS) است که نقش شاتلی را مابین هسته و سیتوپلاسم بازی می کند (۳۶). یکی از مشخصات بارز تغییر و تحول کروماتین در طی اسپرماتوژنز گذار متوالی هیستون متصل به ژنوم در اسپرماتوسیت های اولیه به پروتامین متصل به ژنوم در اسپرماتیدهای کشیده است. لزوم این گذار جدا شدن موقتی رونوشت و ترجمه در اسپرماتید در حال تکامل است و نتیجه ی آن یک تراکم شدید بوده و احتمالاً رونویسی ساختار کروماتین خاموش می شود. از این رو اعتقاد براین است که تنظیم پروتامین به شدت به جدا شدن موقتی رونوشت و ترجمه در اسپرم در حال تکامل وابسته است (۳۷). مکانیسمی که توسط آن عمل سرکوب ترجمه در اسپرماتوژنز صورت می گیرد به طور کامل درک نشده است. حضور ریبونوکلوپروتئین^{۴۷}، کمپلکس پروتئین های متصل به RNA^{۴۸} و mRNA در اسپرماتیدهای گرد و کشیده واضح است. RBPs فسفریله شده متصل به mRNAs با سکانس کوچک ویژه درهمکاری با mRNPs منجر به مهار ترجمه می شود. تغییر و تحول کمپلکس های mRNP باعث رها شدن mRNA های قابل ترجمه و از سر گرفتن سنتز پروتئین ها می گردد (۳۷).

در مطالعات Hammoud و همکاران (۲۰۰۹) تغییرات ژنی Contrin در ۲۸۸ مرد مبتلا به نقص شدید در روند اسپرماتوژنز از جمله آواسپرمی، اولیگواسپرمی شدید، و نمونه های با کمبود بررسی شده است. نتایج آنها پانزده جایگاه پلی مورفیسم را آشکار کرده اند. هفت پلی مورفیسم در یک فرکانس آماری بالاتری در بیماران مبتلا به ناباروری حضور داشتند، به خصوص در مردان با بیان غیر طبیعی پروتامین. از تعداد هفت جایگاه، دو جایگاه منجر به جایگزینی اسید آمینه در دامین shock cold حفاظت شده می شود. یکی منجر به تغییر {کدون} مترادف بسیار قابل توجه در اگزون ۸ از بیماران نابارور می شود. فراوانی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در بیماران مبتلا به ناباروری بطور قابل توجهی بالا بود، به خصوص در مردان با بیان غیر طبیعی پروتامین. در این مطالعات نویسندگان نشان دادند که Contrin نقش بالقوه در روند اسپرماتوژنز مرد دارد، و این تغییرات ژنی به عنوان یک علت بالقوه ناباروری با علل مردانه است (۳۷).

⁴⁷. Messenger ribonucleoproteins (mRNPs)

⁴⁸. RNA-binding proteins (RBP)

فصل دوم

مرور و بررسی متون

ناباروری مردان شامل ۵۰٪ از ناباروریها میباشد، که حدود ۵۰ درصد از مردان نابارور یا علت ناشناخته دارند و یا ایدیوپاتیک می باشد؛ در این شرایط علتی نمی توان مشخص کرد (۳۷) و (۳۸). یکی از علل اصلی ناباروری در مردان عوامل ژنتیکی می باشد که شامل اختلال در اسپرماتوژنز است (۳۹). ریزحذف Yq و ناهنجاری کروموزومی دو علت اصلی اختلال اسپرماتوژنز است (۴۰). علاوه بر آنها، جهش ژنهای اتوزوم، نیز به ناباروری مردان مربوط می شود. با این حال، مکانیسمهای ملکولی زمینه ساز هنوز هم نا شناخته است (۳۹) و (۴۱) در طول اسپرمیوژنز، PRMS به صورت گام به گام جایگزین هیستون سوماتیک میشود، و باعث بسته بندی DNA در اسپرمی که در سلول های سوماتیک یافت شده می شود (۴۲). روشن است که تنظیم اختلاط پروتامین در کروماتین مربوط به عدم هم زمانی رونویسی و ترجمه است (۴۳). در این راستا، برخی از ribonucleoprotein messenger (mRNPs) معرفی شد که در گرد و دراز شدن اسپرماتید تاثیر دارد (۴۴). این mRNPs به mRNA پروتامین باند می شوند و ترجمه را مهار میکنند. این ژن در کروموزوم Xenopus DNA/RNA-binding and mouse MSY2 YBX2 p13.1^{۱۷} است. که یک همولوگ انسانی proteins (۴۵) و (۴۶).

برخی از مطالعات در مدل های حیوانی نشان داد، این پروتئین به وفور در بافت بیضه وجود دارد و در سلول های زایا میوز و ارسال میوز را بیان می کند (۴۵) و (۴۶).

یکی از مهمترین خصوصیت های remodeling کروماتین جایگزینی پروتامین به جای هیستون در مرحله اسپرماتید طولی می باشد (۴۷-۵۰). این جایگزینی نیاز به بیان مکرر DNA و mRNA در اسپرماتید در حال تغییر دارد (۵۱-۵۳). این امر باعث به وجود آمدن کروماتین فشرده و تا حدی خاموش از لحاظ بیان ژنها می گردد (۴۸). بنابراین اعتقاد بر این است که جایگزینی پروتامین در ساختار کروماتین نیاز به بیان غیر همزمان در سطح DNA, mRNA دارد (۵۴). مکانیسم دقیق تنظیم بیان ژن در مرحله فشرده شدن کروماتین هنوز مشخص نمی باشد. ولی نشان داده شده است که ribonucleoprotein (mRNAP) و کمپلکس mRNA و پروتئین های متصل شونده به آن در این امر نقش عمده های داشته و در اسپرماتید گرد و طولی به وفور دیده شده اند (۴۴). پروتئین متصل شونده به mRNA هنگامی که به mRNA متصل می گردد به صورت فسفریله است و دفسفریلاسیون آن باعث می گردد که mRNA ای باید ترجمه گردد رها شده و ترجمه شود (۵۵) و (۵۶).

تعدادی از پروتئین های متصل شونده به mRNA در سلول های جنسی موش و همولوگ آن در انسان شناخته شده است (۵۷-۵۹) یکی از خانواده های پروتئین های متصل شونده به mRNA خانواده پروتئین های Y-

box می باشند که در موش تحت عنوان MSY1,MSY2,MSY4 می باشند (۶۰-۶۲) و (۳۳). MSY2 یکی از مهمترین پروتئینهای متصل شونده به DNA, mRNA می باشد که ۰,۷ پروتئینهای اسپرماتید را تشکیل می دهد (۶۳). در بیضه موش بیشترین میزان بیان ژن MSY2 در اسپرماتید گرد می باشد و نقش پایدار کننده mRNA را دارد (۶۴). این پروتئین همچنین نقش فاکتور رونویس را ایفا می نماید به دلیل اینکه در سلولهای جنسی به توالی Y-box ژن پروتامین ۲ متصل شده و در تنظیم بیان آن نقش دارد (۶۵) و (۳۳). همچنین مطالعات نشان داده اند که این پروتئین به عنوان یک shuttle عمل می نماید و در انتقال mRNA از هسته اسپرماتید به سیتوپلاسم نقش دارد (۳۲ و ۶۳ و ۶۶). مطالعاتی که روی موش Knockout انجام گرفته نشان داده است که این موشها از لحاظ فنوتیپی به صورت نرمال هستند ولی نابارور می باشند (۳۲). در این موشها اسپرماتوژنیزس در مرحله بعد از میوز متوقف گشته و اسپرماتیدها به صورت آتروفه و چند هسته ای بوده و اسپرماتوژوا در اپیدیدیم مشاهده نمی گردد (۶۶). جایگزینی پروتامین در اسپرماتیدهای بالغ در این موشها هنوز گزارش نشده است ولی به احتمال زیاد تحت تاثیر قرار می گیرد به دلیل اینکه بررسی اسپرماتیدها نشان داده است که در این موشها اسپرماتیدها در مرحله گرد باقی مانده و به صورت طویل در نمی آیند که در این امر پروتامین نقش عمده های دارد. مطالعات جدید نشان داده اند که همولوگ انسانی ژن MSY2 در بیضه به میزان زیادی بیان می گردد و YBX2, Contrin نامیده می شود (۶۷). این ژن بر روی کروموزوم ۷p۱۱,۲ قرار دارد و ۶Kb طول داشته دارای ۹ اگزون می باشد و ۷ رونویس دارد و پروتئینی به طول ۳۶۴ آمینو اسید کد می کند. در طرح قبلی مجری این طرح کاهش میزان بیان این ژن در بافت بیضه مردان آرواسپرم نشان داده شده است که مقاله مربوطه در حال داوری است و از طرف دیگر در ۲ مطالعه در سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ نتایج توالی یابی این ژن نشان داد که برخی از جهشها به خصوص در اگزونهای ۸ و ۱ و در نواحی ایترونی به طور معنی داری در مردان نابارور بیشتر از بارور می باشد و این ژن به عنوان یکی از ژنهای مهم دخیل در ناباروری مردان معرفی شده است (۶۸-۶۹). در این تحقیق بر آن شدیم دو تا از پلی مورفیسم های شایع این ژن را در اگزون ۱ که به صورت یک ناحیه حفاظت شده است مورد بررسی قرار دهیم.

YBX۲ یک پروتئین اختصاصی سلولهای جنسی بوده و قابلیت اتصال به DNA و mRNA دارد. (۲۹)

ژن YBX۲ را در انسان کلون نمودند و نام آن را Contrin گذاشتند. این محققین عنوان نمودند که این پروتئین ۳۶۴ آمینو اسید داشته و وزن ۳۸,۶ کیلو دالتون دارد و غنی از آرژنین و پرولین می باشد. یک

cold-shock domain (CSD) در انتهای N ترمینال داشته ، ۷ جایگاه فسفوریلاسیون برای آنزیم کازئین کیناز II و ۳ جایگاه فسفوریلاسیون برای آنزیم پروتئین کیناز C دارد. این پروتئین با همولوگ موشی خود ۹۳٪ تشابه آمینو اسید دارد.(۲۹)

با استفاده از تکنیک ایمنو هیستو شیمی نشان دادند که این پروتئین به میزان بالا در اسپرماتوگونی ، اسپرماتوسیت و به صورت معمولی در تروفوبلاست و به میزان کم در ریه ماهیچه و قلب بیان می شود. برعکس بیان کم این ژن در سلولهای سوماتیک در برخی از کارسینوماها بیان زیاد این ژن گزارش شده است.(۷۰)

در چین توالی این ژن را در ۲۱۰ مرد بارور و ۳۲۶ مرد نابارور مورد بررسی قرا دادند این گروه ۸ ناحیه پلی مورفیک را معرفی کردند. ۲ آلل $c.187T>C$, $c.1095+16A>G$ در مردان نابارور فراوانی بیشتری داشته و در واقع به عنوان یک فاکتور محافظ در برابر اسپرماتوژنز ناقص عمل می نماید. هاپلوتایپ GTCTA دارای ۵ نوکلئوتید پلی مورفیک بوده که در مردان نابارور فراوانی بیشتری دارد.(۶۹)

اهداف و فرضیات (OBJECTIVE & HYPOTHESIS):

الف-هدف اصلی طرح (General Objective)

بررسی فراوانی پلی مورفیسم های rs8069533 و rs222859 در ژن YBX2 مردان آروسپرما

ب-اهداف فرعی (Specific Objectives):

۱- بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs8069533 در ژن YBX2 در نمونه خون مردان آروسپرما

۲- بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs8069533 در ژن YBX2 در نمونه خون مردان بارور

۳- بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs222859 در ژن YBX2 در نمونه خون مردان آزوسپرما

۴- بررسی فراوانی پلی مورفیسم rs222859 در ژن YBX2 در نمونه خون مردان بارور

د-فرضیه ها (Hypothesis)

۱- آیا فراوانی پلی مورفیسم rs8069533 در ژن YBX2 در مردان نابارور بیشتر از مردان بارور می باشد؟

۲- آیا فراوانی پلی مورفیسم rs222859 در ژن YBX2 در مردان نابارور بیشتر از مردان بارور می باشد؟

فصل سوم

مواد و روش کار

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (قزوین، ایران) تصویب شد و بیماران موافقت آگاهانه، خود را اعلام کردند.

تمام نمونه ها در طول سال ۲۰۱۲-۲۰۱۴ از مرکز باروری و ناباروری بیمارستان شریعتی، تهران، ایران جمع آوری شدند.

ما نمونه های خون را از دو گروه، ۹۶ مرد بارور با اسپرم زایی طبیعی، به عنوان نمونه شاهد به دست آوردیم، هیچ یک از مردان بارور سابقه بالینی واریکوسل، کریپتورکیدیسم نداشتند، و همه آنها آنالیز مایع منی طبیعی داشتند. نمونه بیماران مردان مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی، اولیگواسپرم آستنواسپرم بود. ۶۰ نمونه در گروه مردان آزواسپرم وجود داشت. این افراد قبلاً تشخیصی با هر شرایطی در ارتباط با نازایی نداشتند (به عنوان مثال، فیروز سیستمیک، سندرم کلاین فلتز، واریکوسل، شیمی درمانی، ژن AZF حذف میکرو، و غیره).

برای مطالعه پلی مورفیسم در نمونه بیوپسی بیضه، بافت بیضه از ۶۰ مرد با آزواسپرمی غیرانسدادی، که آنها کاندیدی برای روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE) و بافت شناسی بیش از ۶۰٪ از نمونه توقف بلوغ به دست آمد.

در این راستا، نمونه شاهد ۱۲ بیمار مبتلا به آزواسپرمی انسدادی بعد از وازکتومی بودند. بیوپسی ها برای تشخیص دلایل در طول وازکتومی ریورسال انجام شد.

این نمونه برداری اسپرماتوزن نرمال را نشان داد و به عنوان شاهد انتخاب شدند.

استخراج DNA:

در این تحقیق از کیت Diatom DNA Prep 100 (ژن فن آوران تهران) استفاده شد.

مواد و وسائل مورد نیاز

- (۱) محلول لیز کننده (ژن فن آوران)
- (۲) سالین بافر (ژن فن آوران)
- (۳) نوکلئوز (ژن فن آوران)
- (۴) Extragene_E (ژن فن آوران)
- (۵) میکروسانتریفوژ (Sigma)
- (۶) ورتکس یا شیکر (IKA, Germany)
- (۷) سمپلر متغیر (از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) (Eppendorf, Germany)
- (۸) پمپ هوا برای خارج کردن مایعات
- (۹) نوک سمپلر زرد و آبی
- (۱۰) میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری

روش کار

- (۱) ابتدا بافر سالین آماده و سپس استفاده شد. بدین منظور محتویات فالكون حاوی ۵ میلی لیتر سالین بافر ۱۰X داخل ظرف استوانه ای مدرج ریخته شد. سپس حجم را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و حجم با الکل ۹۶ درصد به ۳۰۰ میلی لیتر رسانده شد سالین بافر آماده در ظرف سرپوشیده تحت ۴ درجه سانتیگراد نگه داشته شد.
- (۲) ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه هموژن مورد نظر برداشته شده و در داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و مشخصات نمونه روی میکروتیوپ مربوطه نوشته شد.

(۳) ماده لیز کننده به میزان ۴۰۰ میکرولیتر به نمونه اضافه شد و ۱۰-۸ مرتبه با بالا پائین کردن محیط هم زده شد و در صورت نداشتن ته نشین کار ادامه داده شد.

(۴) نمونه ها در داخل بن ماری ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

(۵) جذب کننده نوکلئوز به میزان ۲۰ میکرولیتر به نمونه ها اضافه شد.

(۶) به مدت ۱۰ دقیقه به طور آرام با بالا و پایین کردن محیط هم زده شد.

(۷) به مدت ۱۰ ثانیه در سرعت ۵۰۰۰ g نمونه ها سانتریفوژ شد.

(۸) بعد از سانتریفوژ بخش بالائی نمونه ها بیرون ریخته شد و مقادیر اضافی با میکروپیت خارج شد تا اینکه فقط باقی مانده که به صورت جامد است باقی بماند.

(۹) به رسوب سفید رنگ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر ماده لیز کننده اضافه شده و محیط با ورتکس چنان مخلوط شد که محیط یکسانی حاصل شود.

(۱۰) سپس به محیط همگن شده سالین بافر به میزان ۴۰۰ میکرولیتر اضافه شد و محیط چند بار با بالا و پایین کردن خوب هم زده شد.

(۱۱) به مدت ۱۰ ثانیه در سرعت ۵۰۰۰ g محیط سانتریفوژ شد و سطح بالائی مایع بیرون ریخته شده و مقادیر اضافی با میکروتیوپ خارج شد.

(۱۲) به محیط حاوی رسوب سفید رنگ ۵۰۰ میکرولیتر سالین بافر اضافه شده و با ورتکس خوب هم زده شد.

(۱۳) به مدت ۱۰ ثانیه در سرعت ۵۰۰۰ g محیط سانتریفوژ شد و سطح بالائی مایع بیرون ریخته شده و مقادیر اضافی با میکروتیوپ خارج شد.

(۱۴) نمونه ها به صورت در باز و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

(۱۵) به محیط ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر از ماده Extragene E اضافه شده و با ورتکس خوب هم زده شد تا همگن شود.

(۱۶) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد میکروتیوپها قرار داده شد.

۱۷) محیط را پس از آنکوبه کردن با ورتکس همگن کرده و با سرعت ۱۰۰۰ g و برای ۲ دقیقه محیط سانتریفوژ گردید.

۱۸) در مرحله پایانی بخش بالایی میکروتیوپها را که دارای DNA می باشد با میکرو پیپت برداشته و به میکروتیوپها منتقل گردید.

بررسی کیفیت DNA استخراج شده

در این مرحله جهت اندازه گیری میزان DNA استخراج شده، از نمونه DNA ای استخراج شده به میزان ۱ میکرولیتر به داخل منفذ مربوط به دستگاه Nano Drop (Thermo,USA) ریخته شد و توسط دستگاه میزان جذب محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. حال با توجه ضریب جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر مقدار DNA برحسب نانوگرم توسط نرم افزار دستگاه حساب شد.

همچنین نسبت جذب (Absorbance) ۲۶۰ نانومتر به جذب ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) به منظور بررسی میزان آلودگی RNA یا پروتئین تعیین گردید. نسبت حاصله در صورتیکه بین ۱/۸ تا ۲ باشد، مطلوب است که در این تحقیق نمونه های DNA با نسبت ۱/۷-۱/۸ مورد استفاده قرار گرفت. در ضمن حدود ۲ میکرو لیتر از محلول DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید تا از کیفیت DNA بدست آمده اطمینان حاصل گردد (شکل ۶)

الکتروفورز ژل آگارز

محلولها و وسایل مورد نیاز

۱) پودر آگارز (Gibco)

۲) بافر الکتروفورز Tris-Borate-EDTA (5x)

۳) اتیدیوم بروماید (Sigma)

(۴) بافر سنگین کننده (5X)

(۵) DNA مارکر (Fermentas)

(۶) تانک الکتروفورز (پایا پژوهش)

(۷) شانه و رک ژل (پایا پژوهش)

(۸) تامین کننده جریان الکتریسته DC (پایا پژوهش)

(۹) دستگاه ژل داگ (UVI Tech)

(۱۰) سمپلر (Eppendorf)

(۱۱) سر سمپلر

روش انجام الکتروفورز ژل آگارز

در این تحقیق در کلیه مراحل از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. برای تهیه ژل آگارز ۱٪ به صورت زیر عمل شد:

(۱) به ۰/۳ گرم از پودر آگارز ۳۰ میلی لیتر بافر (1X) TBE اضافه گردید.

(۲) مخلوط حاصل بر روی حرارت قرار داده شد تا آگارز در بافر حل شود و محلول شفاف ایجاد گردد.

(۳) محلول فوق در دمای اتاق قرار داده شد تا به دمای حدود ۴۵-۴۴ درجه برسد.

(۴) قالب مورد نظر برای تهیه ژل روی سطح صاف قرار داده شد. شانه در ۰/۵ سانتی متری در بالای قالب ثابت گردید.

(۵) ژل به آرامی به درون قالب ریخته شد به گونه ای که در آن حباب تشکیل نگردد.

(۶) پس از سفت شدن ژل شانه از ژل خارج گردید تا چاهک ها در ژل نمایان شود. عمق چاهک ها باید مناسب باشد. همچنین ژل باید قطر مناسبی داشته باشد. هر چه ضخامت ژل کمتر باشد

باندها وضوح بیشتری خواهند داشت. معمولاً ژل هائی با ضخامت حدود ۵-۳ میلی متر مناسب می باشند.

۷) ژل درون تانک الکتروفورز حاوی TBE (با غلظتی مشابه غلظت TBE درون ژل) قرار داده شد به گونه ای که بافر حدود ۲ میلی متر سطح ژل را بپوشاند.

۸) ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر لودینگ به آرامی درون چاهک ژل آگارز بارگزاری گردید.

۹) الکترودها به گونه ای به منبع نیرو وصل شدند که نمونه های داخل ژل در سمت الکتروود منفی قرار داشته باشند.

۱۰) نمونه ها با ولتاژ ۸۰ تا ۹۰ ولت بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند.

۱۱) زمانی که رنگ به ۳/۴ طول ژل رسید جریان برق قطع و ژل به تانک حاوی اتیدیوم بروماید منتقل گردید.

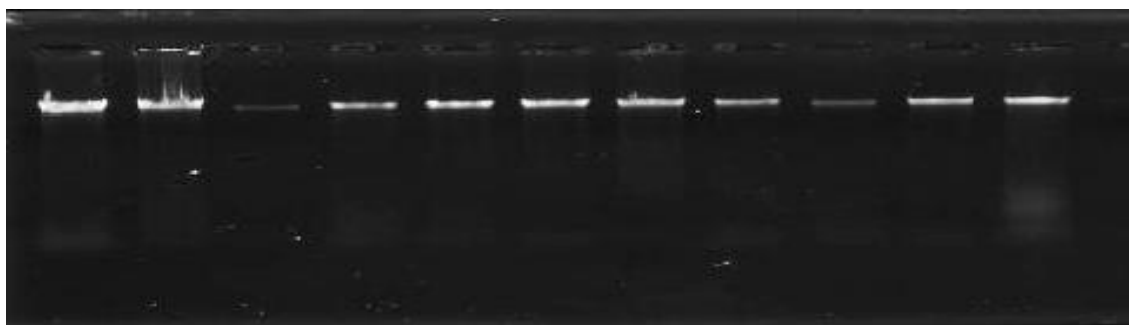
رنگ آمیزی ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید

اتیدیوم بروماید ماده ای سمی با بار مثبت می باشد که بین دو رشته اسید نوکلئیک وارد شده و در اثر دریافت پرتو ماوراء بنفش فلورسنت سفیدی ساطع می کند.

۱) ژل به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در محلول رنگ قرار داده شد.

۲) جهت حذف رنگ اضافی ژل به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در آب مقطر قرار گرفت.

۳) ژل زیر نور ماوراء بنفش قرار داده شد. با تابش پرتو ماوراء بنفش به ژل باندهای DNA تکثیر شده قابل مشاهده بودند.



شکل ۶- کیفیت DNA استخراج شده از نمونه خون مختلف افراد

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به صورت زیر بود:

Table 1: Oligonucleotid primers that used for Real time PCR assay	
Target and internal Amplicon size (bp) control genes	Sequence
YBX2	F:CCCTACCCAGTACCCTGCT R:CCTTCCTTCAACCCTTGATAA
150	
Gapdh	F: TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R:CGCTGTTGAAGTCAGAGGAG

تکثیر مناطق مورد مطالعه توسط PCR

مواد و وسائل مورد نیاز

Master mix 10x (MBI, Fermentas) که شامل مواد زیر می باشد:

(۱) بافر PCR با ترکیبات زیر

MgCl₂
dNTPS

Taq DNA Polymerase

(۲) پرایمر Forward با غلظت 5 pmol/μl (تکاپوزیست)

(۳) پرایمر Reverse با غلظت 5 pmol/μl (تکاپوزیست)

(۴) نمونه DNA (۱۰۰-۵۰ نانوگرم).

(۵) آب مقطر استریل

(۶) سمپلر متغیر (Eppendorf, Germany)

(۷) میکروتیوپ ۰/۵ میلی لیتر

(۸) دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf mastercycler gradient, Germany)

روش کار

(۱) ابتدا Master mix در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری تهیه شد، نوع و نسبت ترکیبات عبارتست از:

(۱) 2 x PCR master mix , ۱۲/۵ میکرولیتر , 1x

(۲) Forward Primer , ۱ میکرولیتر , 0/2 pmol/μl

(۳) Reverse Primer , ۱ میکرولیتر , 0/2 pmol/μl

(۴) آب مقطر دو بار تقطیر استریل , ۹/۵ میکرولیتر

(۵) DNA , ۱ میکرولیتر

که حجم کل ۲۵ میکرولیتر میشود.

۲) پس از تهیه، مخلوط مورد نظر ورتکس شده و فیوژ گردید . مقادیر ذکر شده در بالا برای یک نمونه است. معمولا گرادیانت دمائی در ۵دمای مختلف گذاشته شد به همین دلیل مقادیر ذکر شده ۵برابر گردید.

۳) سپس در میکروتیوپهای ۰/۵ میلی لیتری به میزان ۲۵ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده ریخته شد.

۴) در این مرحله برنامه گرادیانت دستگاه ترموسایکلر بر اساس رنج دمائی مورد نظر طبق برنامه زیرتنظیم گردید سپس هر کدام از میکروتیوپها در دستگاه و در محل مناسب (مربوط به دمای مربوطه) قرار گرفتند.

دما	زمان	
۹۴°	۳ دقیقه	
۹۴°	۱ دقیقه	
۵۲-۶۲°	۱ دقیقه	۳۰ سیکل
۷۲°	۱ دقیقه	
۷۲ °	۵ دقیقه	

تعیین توالی از محصولات PCR با توجه به روش سانگر با استفاده از توالی یاب مویرگی ABI 3730XL انجام شد. نتایج تعیین توالی مقایسه شده بود با توالی نرمال ژن YBX2 (NC_000017.11) که از NCIB به دست آمده بود.

وب سایت: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

همچنین توالی یابی با استفاده از نرم افزار Chromas (نسخه ۲,۴) جمع اوری شده بودند.

آنالیز داده ها:

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (شرکت، شیکاگو، ایلینوی، ایالات متحده) انجام شد. ارتباط بین ژنوتیپ و ناباروری با محاسبه نسبت شانس ($OR_{95\%}$) و فاصله اطمینان ($CI_{95\%}$) از تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک مورد بررسی قرار گرفت. تعادل هاردی واینبرگ برای پلی مورفیسم مورد آزمایش قرار گرفت. علاوه بر این، یک تجزیه و تحلیل راه واریانس (ANOVA) برای تعیین تفاوت در نسبت بیان بین گروههای مورد مطالعه انجام شده است. $P > 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

فصل چهارم

نتایج و یافته ها

Exon1 ژن YBX2 دارای ۱۰ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی است. (SNPs). ما همه این SNP ها را در نمونه ها ارزیابی کردیم، اما تنها ۲ پلی مورفیسم تفاوت فراوانی واضح در میان گروه های مورد مطالعه داشت.

این پلی مورفیسم ها $rs222859 G > T$ و $rs8069533 T > C$ بودند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که فراوانی پلی مورفیسم $rs8069533 T > C$ دارای تفاوت معنی داری بین دو گروه بیمار و کنترل در همه ژنوتیپها نبود. (جدول ۲)

در مطالعه پلی مورفیسم $rs222859 G > T$ فراوانی ژنوتیپ TT در نمونه آواسپرم (۲۴٪) در مقابل آنهایی که طبیعی بودند (۸٪) به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.05$). در فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GT تفاوت معنی داری بین بیماران آواسپرم و افراد نرمال نشان داده نشده است. ($P > 0.05$).

از آنجا که در پلی مورفیسم $rs222859 T < G$ ، فراوانی ژنوتیپ TT در نمونه های خون مردان آواسپرم به طور قابل توجهی بالاتر بود، ما فراوانی ژنوتیپ های مختلف این پلی مورفیسم را در بافت بیضه افرادی که کاندید روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE) بودند ارزیابی کردیم.

نتایج نشان داد که همه ۱۳ تا از مردان آواسپرمی که ژنوتیپ TT در نمونه های خون خود داشتند، همان پلی مورفیسم را در بافت بیضه داشتند.

از نظر ژنوتیپ GG، ۲۳ نفر از ۲۵ تا آواسپرمیای این ژنوتیپ را در نمونه های خون و بیضه ها خود داشتند، و ۲ تا از آنها ژنوتیپ TT در نمونه بیضه داشتند. (جدول ۳).

Table 2: Distribution of genotypes of studied polymorphisms in case and control groups					
YBX2 SNPs	Genotypes	Control (n= 96)	Azoo (n= 70)	OR	CI (95%)
rs8069533	TT	%62	%66	-	-
	TC	%34	%32	1.19	(0.6-1.9)
	CC	% 2	%4	0.49	(0.08-2.7)
rs222859	GG	%58	%50	-	-
	GT	%34	%23	1.7	(0.92-3.2)
	TT	%8	%24	0.2	(0.1-0.6)**

Note: ** indicate significant difference between patients and control groups (P<0.05).

Table 3: Comparison of rs222859 different genotypes frequency between blood and testis tissues of azspermic men		
Type of mutation	Azoospermic men which had TT genotype in their in blood samples	Azoospermic men which had GG and GT genotypes in their blood samples
rs222859 (Exon1)	GG - GT - TT 13(100%)	GG 22(%59) GT 12(%29) TT 3(%8)

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

پیشنهادها

بیش از ۳۰۰۰ ژن وجود دارد که نقش خاص در باروری مردان دارد (۳۶). در مطالعات مدل حیوانی، نشان دادند که موش مطالعه Msy2- null میزان بالایی ابنورمالیتی در اپوپتوز میوز اسپرماتوسیتها دارد. و مردان جهش دار، فاقد اسپرم در اپیدیدیم بودند و نازا بودند. (۳۱)

این نتایج نقش اصلی این پروتئین را در باروری مردان نشان می داد. این تحقیق اولین گزارش از مطالعه ارتباط بین برخی پلی مورفیسم که کلید تنظیم اسپرماتوژنز (ژن YBX2) و ناباروری مردان در میان ایرانیان است.

ما نمونه ها را انتخاب کردیم بر اساس تجزیه و تحلیل مایع منی انتخاب کردیم و آنها را به دو گروه کنترل، آزواسپرم تقسیم کردیم. پلی مورفیسم مورد مطالعه توسط حمود و همکاران انجام شد. (۲۰۰۹) و دنگ و همکاران (۲۰۰۸). آنها تمام اگزون ها و اینترون های این ژن را توالی یابی کردند، و برخی از پلی مورفیسم ها را در اگزون و اینترون این ژن گزارش کردند. برخی از این پلی مورفیسم ها در مردان نابارور به طور قابل توجهی بالاتر بود و در ارتباط با تولید اسپرم و / یا عملکرد اسپرم است. ما تغییرات اگزون ۱ را بررسی کردیم. چرا که در مطالعات فوق در میان مناطق اگزونی مورد مطالعه، پلی مورفیسم اگزون ۱ بالاتر از دیگران بودند. (۳۷) و (۶۹)

Exon1 از این ژن یک دامنه شوک سرد به شدت حفاظت شده در میان گونه های پستانداران دارد و شامل مکانی برای فسفوریلاسیون کازئین کیناز ۲ است (۷۱).

نتایج ما نشان داد که فراوانی تنها یک پلی مورفیسم ژنوتیپ TT از پلی مورفیسم rs222859 در مردان آزواسپرم در مقایسه با کنترل به طور قابل توجهی بالاتر بود.

در مطالعه ی دنگ و همکاران (۲۰۰۸) مشخص شد که برخلاف مطالعه ما، ژنوتیپ TT در اگزون ۱ تفاوت معنی داری بین مردان کنترل و نابارور در میان جمعیت چین ندارد. (۶۹)

در مورد پلی مورفیسم rs8069533 $C < T$ ، دنگ و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که فراوانی آلل C در گروه شاهد بالا بود در مقایسه با مردان نابارور و به این نتیجه رسیدند که این آلل اثر محافظتی بر روی باروری بود (۶۹)، اما در مطالعه ما تفاوت معنی داری بین دو گروه شاهد و بیماران وجود ندارد. پلی مورفیسم exon1، که در مطالعه ۲۰۰۹ توسط حمود و همکاران گزارش شده است. ، تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در مطالعه ما نشان نداد (۳۷). همچنین نتایج ما نشان داد که پلی مورفیسم rs222859 در همه بیماران که جهش ژنوتیپ TT در نمونه خون آنها بود همان ژنوتیپ را در بافت بیضه خود داشتند.

فراوانی ژنوتیپ GT در خون و بافت بیضه یکسان بود، اما در ۸٪ از بیماران که ژنوتیپ GG طبیعی در نمونه خون آنها بود، آنها TT یا ژنوتیپ های جهش یافته ان را در بافت بیضه خود داشتند. در مطالعات مختلف، تناقضی بین سلول های خون و germ گزارش شده است. Dada و همکاران ۲۰۰۷ و Saktivel و همکاران ۲۰۰۸ به ترتیب، اشاره کردند که فراوانی ریزحذف Yq در نمونه اسپرم بیماران در مقایسه با نمونه

خون آنها بالاتر بود (۷۱-۷۲). Khazamipour و همکاران ۲۰۰۹، متیلاسیون ژن MTHFR در بافت بیضه بیماران آزواسپرم نشان دادند، اما آنها این متیلاسیون در نمونه های خون بیماران خود یافت نکردند. این نتایج نشان می دهد که غربالگری جهش ژنهایی که در روند اسپرماتوژنز در نمونه های خون کافی نیست. بهتر است برای غربالگری نمونه های اسپرم هم ارزیابی شود. (۷۳) در تحقیقات قبلی، ما بیان این ژن را در بافت بیضه مردان آزواسپرم با توقف بلوغ نسبت به گروه کنترل (نجفی پور و همکاران، ۲۰۱۵) نشان داده ایم. (۷۴)

پیشنهادهات:

در مطالعات آینده بهتر است به بررسی اثر این جهش در ساختار ۳D پروتئین انجام شود. بیان این ژن در نمونه های خون و اسپرم مردان آزواسپرم احتمالاً توسط جهش در دیگر پروموتورها و دیگر مناطق اگزونی و اینترونی این ژن ایجاد می شود. ما غربالگری از تمام promotore، اینترون ها و اگزون ها این ژن در میان جمعیت ایران در مطالعات آینده پیشنهاد میکنیم. در نتیجه، اطلاعات موجود نشان می دهد که ژن YBX2 ممکن است با ناباروری مردان در ارتباط باشد و بهتر است جهش های نمونه اسپرم و نمونه خون در مطالعات آینده بررسی شود.

فصل ششم

فهرست منابع

Reference :

- 1)World Health Organization 2000 .WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge: Cambridge University Press.
- 2)Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H., Diemer T2012. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility. european urology . 62: 324-323.
- 3)World Health Organization 2010. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th edn. Cambridge: Cambridge UniversityPress.
- 4)Alaa Hamada Sandro C2011. Estevesand Ashok Agarwal Unexplained male infertility: potential causes and managemenHuman Andrology. 1:2–16.
- 5)Holstein AF1999.Spermatogenese beimMenschen. Grundlagenforschung und Klinik. Ann Anat. 181:427-436.
- 6)Holstein AF2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reproductive Biology and Endocrinology.1:107.
- 7)Davidoff MS., Breucker H., Holstein AF., Seidel K1990. Cellular architecture of the laminapropria of human seminiferous tubules.CellTissueRes.262:253-261.
- 8)Romero C,updated by Erin Barley with contributions from Joan Sharp 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.
- 9)Holstein AF., Roosen-Runge EC., Schirren C1988. Illustrated pathology of human spermatogenesis. Berlin: Grosse.
- 10)Holstein AF., Roosen-Runge EC1981. Atlas of Human Spermatogenesis. Berlin: Grosse.

- 11)**Breucker H., Schaefer E., Holstein AF1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. Cell Tissue Res. 240:303-309.
- 12)**Clermont Y: The cycle of the seminiferous epithelium in man. Amer J Anat 1963, 112:35-51.
- 13)**SchulzeW,Salzbrunn A1992.Spatial and quantitative aspects of spermatogenic tissue in primates In: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception Edited by:NieschlagE, Habenicht UF.Berlin, Heidelberg. NewYork:Springer.267-283.
- 14)**WHO Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple1993. Edited by: Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ. Cambridge: Cambridge University Press.
- 15)**DeKretser DM, Holstein AF1976.Testicular biopsy and abnormal germ cells. In: Human Semen and Fertility Regulation in Men Edited by: Hafez ESE. St. Louis: Mosby.332-343.
- 16)**Schulze W., Thoms F., Knuth UA1999.Testicular sperm extraction (TESE): comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. Human Reproduction.14:82-96.
- 17)**O'Flynn O'Brien KL., Varghese AC., Agarwal A 2010.The genetic causes of male factor infertility.Fertil Steril .93(1):1-12.
- 18)**Lamb DJ., Lipshultz LI 2000. Male infertility.recent advances and a look towards the future.Current Opinion in Urology.10: 359-362.
- 19)**Keck C., Gerber-Schäfer C., Clad A., Wilhelm C., Breckwoldt M1998. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum Reprod Update. 6:891-903.

20)Dohle GR2003. Inflammatory associated obstructions of the male reproductive tract .*Andrologia*.35: 321-324.

21)Jin-Chun Lu., Yu-Feng Huang., Nian-Qing Lu2008. Antisperm Immunity and Infertility. *Expert Rev Clin Immunol*. 4(1):113-126.

22)Pastore AL., Palleschi G., Silvestri L., Leto A 2012. bstructive and Non-Obstructive Azoospermia. ISBN: 978-953-510562-6,

23)Kantartzi P D., Goulis Ch D., Goulis G D., Papadimas I 2007. Male infertility and varicocele: myths and reality. *HIPPOKRATIA* . 3: 99-104.

24)Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C 2007. Male infertility. role of genetic background. *Reprod Biomed Online*.14: 734–45.

25)Vogt PH2005. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*.10:81–93.

26)Matsumoto K& Wolffe AP 1998.Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol*. 8:318–323.

27)Wilkinson MF& Shyu AB 2001. Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays*. 23, 775–787.

28)Tafuri SR & Wolffe AP1993.Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J. Biol. Chem*. 268: 24 255–24 261.

- 29)** Gu W.,Tekur S., Reinbold R.,Eppig JJ.,Choi YC., Zheng J Z.,Murray MT& Hecht NB1998.Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. Biol Reprod. 59:1266–1274.
- 30)** Xu M & Hecht NB 2008.MSY2 and polypyrimidine tract binding protein 2 stabilize mRNAs in the mammalian testis. Int. J.Androl. 31:457–461.
- 31)**Yang J., Medvedev S., Yu J., Tang LC., Agno JE., Matzuk MM., Schultz RM and Hecht NB2005. Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. Proc Natl Acad Sci USA.102:5755–5760.
- 32)**Yang J., Morales CR., Medvedev S et al 2007. In the absence of the mouse DNA/ RNA-binding protein MSY2,messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. Biol Reprod.76:48–54.
- 33)** Yang J., Medvedev S., Reddi PP., Schultz RM & Hecht NB2005.The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA.102:1513–1518.
- 34)** Bettegowda A and Wilkinson MF2010 .Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis.Phil. Trans. R. Soc. B.365:1637–1651.
- 35)** Medvedev S.,Yang J., Hecht NB & Schultz RM 2008. CDC2A (CDK1) mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation. Dev Biol. 321: 205–215.
- 36)**Tekur S., Pawlak A., Guellaen G and Hecht NB1999.Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. J Androl .20;135–144.

- 37)** Hammoud S., Emery BR., Dunn D., Weiss RB., Carrell DT (2009). Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertil Steril*. 91(4):1090-5.
- 38)** Huynh T, Mollard R, Trounson A (2002) Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 8:183–98.
- 39)** Yang Y, Xiao CY, Zhou-Cun A, Zhang SZ, Li X, Zhang SX (2006) DAZ1/DAZ2 cluster deletion mediated by gr/gr recombination per se may not be sufficient for spermatogenesis impairment: a study of Chinese normozoospermic men. *Asian J Androl* 8:183–7.
- 40)** Totonchi M, Mohseni Meybodi A, Borjian Boroujeni P, Sedighi Gilani M, Almadani N, Gourabi H (2012) Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion. *J Assist Reprod Genet.* 29:847–53.
- 41)** Fernando L, Gromoll J, Weerasooriya TR, Nieschlag E, Simoni M (2006) Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian J Androl* 8:39–44.
- 42)** Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569–574.
- 43)** Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13:313–27.
- 44)** Kleene KC (1996) Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 43:268–81.
- 45)** Kwon YK, Murray M, Hecht NB (1993) Proteins homologous to the *Xenopus* germ cell-specific RNA-binding proteins p54/p56 are temporally expressed in mouse male germ cells. *Dev Biol* 158:90–100.

46)Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB (1998) Mammalian male and female germ cells express a germ-cell specific Y-box protein MSY2. *Biol Reprod* 59:1266–1274.

47)Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C, Dixon GH. Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem*. 1987 Dec 15;262(35):17016-25.

48)Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Jun;199(6):471-87

49)Hecht NB. Regulation of 'haploid expressed genes' in male germ cells. *J Reprod Fertil*. 1990 Mar;88(2):679-93.

50)Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron*. 1995;26(4):323-45.

51)Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 1998 Oct;4(10):939-45

52)Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, Doenecke D, Nieschlag E, Bergmann M, Weinbauer GF. Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl*. 1999 Nov-Dec;20(6):747-54.

53)Steger K, Fink L, Klonisch T, Bohle RM, Bergmann M. Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. *Histochem Cell Biol*. 2002 Mar;117(3):227-34.

54)Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? Hum Reprod Update. 2007 May-Jun;13(3):313-27.

55)Marello K, LaRovere J, Sommerville J. Binding of *Xenopus* oocyte masking proteins to mRNA sequences. Nucleic Acids Res. 1992 Nov 11;20(21):5593-600.

56)Richter JD, Smith LD. Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. Nature. 1984 May 24-30;309(5966):378-80

57)Cooke HJ, RNA-binding proteins and human male infertility. Elliott DJ. Trends Genet. 1997 Mar;13(3):87-9.

58)Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M, Familiar M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. New Biol. 1992 Apr;4(4):290-8.

59)Wolffe AP Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. Bioessays. 1994 Apr;16(4):245-51.

60)Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB. Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. Biol Reprod. 1998 Nov;59(5):1266-74.

61)Tafuri SR, Familiar M, Wolffe AP. A mouse Y box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. J Biol Chem. 1993 Jun 5;268(16):12213-20.

62)Tafuri SR, Wolffe AP. Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem*. 1993 Nov 15;268(32):24255-61.

63)Oko R, Korley R, Murray MT, Hecht NB, Hermo L Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. *Mol Reprod Dev*. 1996 May;44(1):1-13

64)Nikolajczyk BS, Murray MT, Hecht NB. A mouse homologue of the *Xenopus* germ cell-specific ribonucleic acid/deoxyribonucleic acid-binding proteins p54/p56 interacts with the protamine 2 promoter. *Biol Reprod*. 1995 Mar;52(3):524-30.

65)Yiu GK, Murray MT, Hecht NB. Deoxyribonucleic acid-protein interactions associated with transcriptional initiation of the mouse testis-specific cytochrome c gene. *Biol Reprod*. 1997 Jun;56(6):1439-49.

66)Ladomery M, Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays*. 1995 Jan;17(1):9-11.

67)Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5):1416-22

68)Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl*. 2001 Jul-Aug;22(4):604-10.

69)Deng Y, Zhang W, Su D, Yang Y, Ma Y, Zhang H, Zhang S. Some single nucleotide polymorphisms of MSY2 gene might contribute to susceptibility to spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Urology*. 2008 May;71(5):878-82.

70) Kohno et al. (2006)

71) Sakthivelet AL ,2008

72) Dada 2007

73) Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhane M, Pujol P (2009) MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility.Hum Reprod 24:2361-4.

74) Najafipour R, Moghbelinejad S, Samimi Hashjin A, Rajaei F, Rashvand Z (2015) Evaluation of mRNA Contents of YBX2 and JHDM2A Genes on Testicular Tissues of Azoospermic Men with Different Classes of Spermatogenesis.Cell J17:121-8.

Summary

Animal model studies have shown, MSY2 gene has a potential role in spermatogenesis. Some mutations on this gene have been proposed to be associated with human male infertility. In this study, polymorphisms of exon1 of YBX2 gene have been investigated. A total of 156 men were evaluated. They included 96 men with normal spermatogenesis, 60 men with non-obstructive azoospermia. We extracted DNA from blood and testis tissues of samples, and analyzed polymorphisms of exon1 by sequencing method. Sequencing results showed that among the studied polymorphisms, frequency of TT genotype in rs222859 polymorphism was significantly higher in azoospermic patients compared to control group ($P < 0.001$). According to our results, YBX2 gene may play a role in male reproduction. The alterations of this gene might be involved in azoospermia among the Iranian population.

Keywords: YBX2 gene, Male infertility, Azoospermia

: